

03072  
5  
2eje.

**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de  
Posgrado del CCH**

**UNAM**

**Un Modelo para Estudiar la  
Diferenciación de las Células Durante el  
Desarrollo Embrionario del Ratón**

**TESIS**

que para obtener el grado de  
Maestra en Biotecnología

presenta

Susana Castro Obregón

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles  
en el Instituto de Biotecnología, UNAM.**

**AGRADEZCO:**

**A los doctores:**

**Dra. Susana López Charretón**

**Dr. Luis Covarrubias Robles**

**Dr. Patricio Gariglio Vidal**

**Dr. Arturo Liévano Mendoza**

**Dra. Alicia González Manjarrez**

**haber aceptado revisar esta tesis y formar parte del jurado en el examen de grado.**

**A DGAPA y a CONACyT por el financiamiento para realizar este trabajo.**

**A la UACPyP del CCH por el apoyo en los trámites administrativos.**

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES PARTICULARES</b>	5
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	7
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	7
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
I. Cultivo de células ES	8
II. Cultivo de células STO	9
III. Congelar y descongelar células	10
IV. Transfección de las células ES	11
<i>Para electroporar</i>	
<i>Para lipofección</i>	
<i>Para seleccionar las colonias</i>	
<i>Para expandir las colonias.</i>	
<i>Para analizar las colonias</i>	
V. Cuantificación espectrométrica de las ES	13
VI. Purificación de ALP	13
VII. Detección de actividad de ALP en gel de acrilamoda 6%	
14	
VIII. Purificación de RNA eliminando completamente el DNA	15
IX. RT-PCR	16
<i>Transcriptasa reversa</i>	
<i>PCR</i>	
<i>Secuencia de los oligos</i>	
X. Inducción de la diferenciación de las ES formando agregados	17
<b>RESULTADOS</b>	19
<b>A) Manipulación de las ES a nivel molecular</b>	19
I. Construcción de los vectores para expresar el RNA antisentido de ALP a partir del promotor del gene RNA ribosomal.	19
II. Transfección y selección de colonias con expresión estable de las construcciones.	19
III. Cuantificación de la actividad de fosfatasa alcalina de una muestra de las colonias transfectadas.	20
IV. Determinación por PCR de la expresión del transcrito antisentido en las colonias transfectadas.	23
V. Comprobación de la inserción en el genoma de la construcción completa.	
23	
<b>B) Manipulación de las ES a nivel celular</b>	24
I. Inducción de la diferenciación hacia el linaje muscular.	24

<b>II. Inducción de la diferenciación hacia el linaje neuronal.</b>	<b>25</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>26</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>28</b>

## INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos fundamentales de la vida es la generación de nuevos individuos. En el caso de los organismos vertebrados, los nuevos individuos se desarrollan a partir de una sola célula, el huevo fertilizado, que debe dividirse y diferenciarse de una manera coordinada temporal y espacialmente para dar lugar a los cerca de 200 tipos celulares que conforman al organismo adulto. La transición de huevo fertilizado a organismo maduro involucra tres procesos: proliferación celular, para aumentar el número de células; morfogénesis, que genera la organización espacial de las células; y diferenciación, que es el proceso por el cual se generan nuevos tipos celulares. El proceso de diferenciación involucra la expresión diferencial y específica de genes en cada tipo celular. Durante la diferenciación ocurre un evento denominado determinación, durante el cual la célula "decide" o se compromete hacia un tipo celular particular<sup>1</sup>. Entender los mecanismos por los cuales se regulan las decisiones celulares para llevar a cabo la organización del embrión, es uno de los objetivos principales de la Biología del Desarrollo.

La complejidad de los sistemas biológicos y las limitaciones técnicas han detenido el avance del entendimiento y forzado a utilizar animales simples como modelo, tales como *Caenorabditis elegans* o *Drosophila*, en los cuales hasta los últimos años se ha empezado a entender a nivel molecular los procesos básicos de diferenciación, proliferación, migración y muerte celular<sup>2</sup>. El organismo más complejo que se ha utilizado como modelo de desarrollo es *Xenopus*, que aunque ha sido muy útil para generar conceptos básicos tal como la inducción celular, proceso por el cual un tipo celular instruye a otro para que diferencie, y donde se han identificado moléculas responsables<sup>2</sup>, tiene la limitación de no poder hacerse genética, especialmente por metodología moderna, ya que hasta la fecha no existe la tecnología para generar anfibios transgénicos. En la búsqueda de modelos adecuados para entender el desarrollo de vertebrados recientemente se empezó a caracterizar el desarrollo de el pez tropical *Zebrafish*, que ofrece varias ventajas: se pueden hacer estudios genéticos equivalentes a la genética de levadura, actualmente se están realizando varios rastreos genéticos para saturar el genoma de mutaciones que afecten la embriogénesis; además, puesto que es transparente se pueden estudiar procesos como migración celular durante la gastrulación o la formación de dominios en el cerebro<sup>3</sup>. Sin embargo, tiene también la limitación de que aún no se establece una metodología eficiente para introducir transgenes que permitan realizar estudios moleculares comparables a los que se pueden realizar en ratón.

Para el caso del estudio de mamíferos gran información ha sido generada utilizando modelos *in vitro* (i.e. cultivo celular), ya que ofrecen la ventaja de la simplicidad al poderse estudiar tipos celulares individuales además de que se puede manipular el micro ambiente. Entre los tipos celulares más utilizados como modelo de diferenciación *in vitro* están las células gliales del nervio óptico de rata, en cuyo sistema se ha comprobado que el proceso de diferenciación para generar los diferentes tipos de células gliales está regulado tanto por interacciones celulares, como por un programa celular intrínseco<sup>4</sup>. En este sistema se identificaron factores que estimulan la proliferación (astrocitos tipo 1 secretan PDGF que induce la proliferación de las células progenitoras O-2A); factores que inducen la diferenciación (astrocitos tipo 1 secretan CNTF que inducen la diferenciación de O-2A hacia

astrocitos tipo 2); y un programa constitutivo de diferenciación hacia oligodendrocitos que involucra un número determinado de divisiones<sup>3</sup>.

Para estudiar la diferenciación de otros tipos celulares se han obtenido líneas celulares que al proliferar semejan fibroblastos, pero en ciertas condiciones de cultivo se pueden inducir a diferenciar. Un ejemplo son las células 3T3 que diferencian hacia adipocitos por diversos agentes, como suero fetal de cabra, insulina, hormona de crecimiento o glucocorticoides<sup>5</sup>. Aprovechando la simplicidad del sistema se han realizado experimentos de sustracción por hibridación para identificar genes que se activan durante el proceso de diferenciación y se ha identificado que varios de los genes que se encienden comparten una región reguladora en la región 5' denominada FSEs (fat specific elements)<sup>6</sup>, lo cual sugiere la existencia de "genes maestros" que regulan un grupo de genes que participan en la diferenciación celular. Estos genes maestros serían los responsables del evento de determinación.

Para abordar el proceso de determinación resulta mucho más ventajoso utilizar células que tengan más potencialidad (más capacidad de diferenciar a diferentes tipos celulares). La línea celular 10T1/2, derivada del embrión entero, tiene la capacidad de diferenciar hacia tres tipos celulares derivados del mesodermo: adipocitos, condrocitos y músculo, cuando son tratadas con 5-azacitidina<sup>7</sup>. Se ha propuesto que 5-azacitidina convierte a las células 10T1/2 en un linaje determinado provocando hipometilación del DNA, lo cual activaría sólo uno o unos pocos genes maestros; si ese fuera el caso, entonces la determinación tendría una simple base genética<sup>8</sup>. En un intento por identificar tales genes reguladores hicieron una sustracción por hibridación para identificar genes que se expresaran en mioblastos proliferando pero no en células 10T1/2 y encontraron el gene *myoD*, un factor transcripcional que al ser transfectado a 10T1/2 induce la diferenciación a miocitos<sup>9</sup>, por medio de la activación de genes específicos<sup>10</sup>. Sin embargo, para comprobar la relevancia fisiológica de *myoD* o cualquier otro gene identificado en cultivo es necesario comprobar que *in vivo* actúa de la misma manera. En el caso de *myoD* fue necesario demostrar en ratones transgénicos que efectivamente fuera éste el determinante del linaje muscular. Sorprendentemente el ratón mutante en *myoD* desarrolló músculo y reveló la importancia de otros genes miembros de la familia de *myoD*, demostrando que los resultados que parecen contundentes *in vitro* pueden no serlo *in vivo* debido a la redundancia e interacciones celulares que no se reproducen en la caja de cultivo.

Un modelo de estudio que facilita la transferencia del sistema de *in vitro* a *in vivo* son las células de teratocarcinoma embrionario (EC), que además tienen una potencialidad mucho mayor que los ejemplos anteriores, aunque ésta varía entre las diferentes líneas aisladas: algunas no tienen capacidad de diferenciación, otras diferencian sólo en respuesta a ciertos inductores y otras diferencian espontáneamente<sup>11</sup>. Las EC pueden inyectarse en blastocistos para hacer embriones quiméricos, ya que dejan de comportarse como células tumorales, se regula su proliferación y diferencian a distintos tipos celulares. Sin embargo, rara vez forman parte de la línea germinal, por lo que es difícil obtener ratones transgénicos a partir de ellas. No obstante, han sido ampliamente usadas como modelo de diferenciación *in vitro* y existen protocolos establecidos para inducir la diferenciación hacia varios tipos celulares<sup>12</sup>.

Considerando las desventajas que presentan, resulta una mejor opción contar con células normales (no tumorales) que presenten las mismas cualidades que las EC, pero

superando las desventajas. Tales células se aislaron a partir de blastocistos, etapa de desarrollo en la que sólo ha habido un evento de diferenciación para generar las células de la masa celular interna, que durán lugar al individuo como tal y por lo tanto son pluripotenciales, y las células del trofoectodermo, que darán lugar a las estructuras extra embrionarias. Las líneas celulares obtenidas provienen de la masa celular interna y se denominan "células embrionarias pluripotenciales" (ES). Se pueden mantener en cultivo por tiempos largos en un estado indiferenciado, en el cual crecen rápidamente si se siembran en presencia de una monocapa de células "feeder". Para inducir la diferenciación se cultivan en ausencia de la monocapa de células "feeder" permitiendo la formación de agregados. Si posteriormente se adhieren los agregados, las células proliferan y salen del agregado, diferenciando espontáneamente a varios linajes celulares: muscular, neuronal, glandular, epitelial, etc. Si los agregados se mantienen en suspensión, forman cuerpos embrionarios huecos equivalentes al saco vitelino visceral, en el cual se forman islas sanguíneas donde se puede estudiar hematopoesis; eventualmente se forman derivados de mesodermo como músculo cardíaco<sup>12</sup>. A diferencia de las EC, todas las líneas celulares tienen una potencialidad comparable y no presentan aberraciones cromosómicas<sup>1</sup>. Son una herramienta para pasar del cultivo celular al embrión entero, ya que se pueden transfectar para introducir genes o interrumpir genes por recombinación homóloga y estudiar las consecuencias sobre la diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que también pueden formar ratones quiméricos. Forman parte de todos los tejidos del ratón, incluyendo la línea germinal, con mayor frecuencia que las EC por lo que son la alternativa más viable para desarrollar ratones transgénicos<sup>13</sup>.

Establecer la manera de dirigir esta capacidad de diferenciar, quizá estocásticamente, de las ES para obtener un linaje celular único, permitiría tener un modelo más representativo de lo que ocurre durante el desarrollo para estudiar los procesos de determinación y diferenciación. Idealmente se podría encontrar la manera de inducir la diferenciación hacia cada linaje celular, gracias a la totipotencialidad de estas células, y hacer manipulaciones moleculares para identificar los "genes maestros" y entender la regulación de cada decisión celular. Con este objetivo se ha establecido un sistema para inducir la expresión génica en respuesta a un inductor, que facilita el análisis de genes que controlan el desarrollo<sup>14</sup>, así como varios sistemas de diferenciación de las ES que han permitido estudiar procesos de determinación, diferenciación, información posicional, etc.

En este sentido, el desarrollo temprano del sistema hematopoyético ha sido el mejor modelado. Schmitt *et al.*<sup>15</sup> lograron inducir la diferenciación de las ES hacia casi todos los precursores de las células formadoras de colonias que se encuentran en la médula ósea y pudieron establecer qué moléculas son importantes para las etapas tempranas del desarrollo. También se ha demostrado que las ES inducidas a diferenciar hacia precursores de linfocitos T y B, así como otros precursores hematopoyéticos, son capaces de reconstituir comportamientos linfoides *in vivo*<sup>16,17</sup>. Este sistema hace posible estudiar el control de la determinación celular y elucidar los eventos moleculares que llevan a la formación de células hematopoyéticas pluripotenciales (stem cells), puesto que se parte de células no hematopoyéticas, así como la proliferación y diferenciación de las células maduras. En este sentido, aprovechando la posibilidad de transfectar las ES, se demostró por ejemplo que el antisentido de *vav*, un proto-oncogene expresado en las células hematopoyéticas, bloquea el proceso de diferenciación<sup>18</sup>.

Estudiando la cardiogénesis que ocurre durante la formación de cuerpos embrionarios se demostró que la especificación regional cardíaca es independiente de información posicional o estímulos físicos, ya que por experimentos de PCR, protección a ribonucleasa, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, se detecta la activación transcripcional y traduccional de un marcador ventricular<sup>19</sup>. La expresión temporal de los factores regulatorios miogénicos, miogénina y myoD, sugieren que la activación *in vitro* del programa hacia músculo esquelético es posterior a la miogénesis cardíaca, lo cual coincide con la progresión de la miogénesis *in vivo*. Estos datos establecen a las células embrionarias pluripotenciales como un modelo para la especificación de la cámara cardíaca<sup>18</sup>, lo cual resulta muy útil puesto que no existe un sistema simple de cultivo permanente de células cardíacas que permita hacer estudios de transfección. Este modelo ha permitido tomar RNA de diferentes estadios de diferenciación para analizar el patrón de expresión de varios genes que se activan durante el proceso<sup>20</sup>.

## ANTECEDENTES PARTICULARES

Considerando la gran potencialidad que ofrece utilizar a las células ES como modelo de diferenciación *in vitro*, en este trabajo se propone establecer los sistemas para manipularlas tanto a nivel molecular como celular, para poder posteriormente responder preguntas concretas. Para manipular a las ES a nivel molecular y conocer el papel de un gene particular en el desarrollo, una estrategia alternativa es bloquear su expresión por medio de una molécula antisentido que bien puede ser DNA o RNA<sup>21</sup>. Para sistemas de diferenciación *in vitro* ha resultado muy útil la microinyección de oligonucleótidos antisentido; con esta estrategia se ha sabido, por ejemplo, que *c-mos* es necesario para que se inicie la segunda división meiótica durante la maduración del ovocito en ratón<sup>22</sup> o que *c-myc* participa en el desarrollo embrionario temprano del ratón<sup>23</sup>. También se ha ensayado bloquear la expresión de globina en *Xenopus* al inyectar RNA antisentido sintetizado *in vitro*<sup>24</sup>. Pero desafortunadamente, no se pueden inyectar todas las células de un organismo en desarrollo, ya que algunas son muy pequeñas o inaccesibles; además, el RNA inyectado se iría diluyendo o degradando conforme el organismo va creciendo. Por eso, una estrategia alternativa es hacer que las células sinteticen su propio RNA antisentido. Uno de los primeros trabajos demostrando la reducción estable de la actividad de una proteína por medio de RNA antisentido expresado por la célula, fue realizado por Kim et. al. En este trabajo transfectan células de ratón con un vector que lleva un fragmento del cDNA de timidín cinasa bajo el control del promotor del gene para la enzima dihidrofolato reductasa, pero requieren seleccionar eventos de amplificación génica para producir mayor cantidad de transcrito necesario para bloquear en un 80% la actividad de timidín cinasa<sup>25</sup>. Hay varios ejemplos en *Drosophila* de transgenes que portan un RNA antisentido bajo el control de un promotor inducible, como el promotor de *hsp70*, donde demuestran que el bloqueo es específico para el mensajero de interés<sup>26</sup>, aunque en muchos casos no es suficiente para bloquear substancialmente la actividad del gene en cuestión<sup>27,28</sup>. Para solventar este problema sería conveniente utilizar un promotor más fuerte. En ratón hay también varios ejemplos de transgénicos donde obtienen el mismo fenotipo de mutantes descritas, útiles como modelos de ciertas enfermedades. En estos casos requieren que el RNA antisentido sea producido exclusivamente por las células involucradas, por lo que utilizan promotores tejido específico como el promotor de la mielina básica (responsable de la mutación *shiverer*<sup>29</sup>) o el promotor de un neurofilamento seguido por la región 3' del cDNA de un receptor a glucocorticoides<sup>30</sup>.

No se sabe cual es el mecanismo por el cual la secuencia antisentido bloquea la expresión del mensajero, pero puede actuar a nivel citoplásmico o nuclear por diferentes mecanismos: degradación rápida del duplex RNA:RNA o RNA:DNA; interferencia con el procesamiento del RNA; bloqueo del transporte al citoplasma o inhibición de la traducción. Se ha observado que dentro de las células los duplex se separan y que las adeninas que estuvieron apareadas con uracilos se modificaron a inosina, lo cual cambia el código genético; esta podría ser un manera de potenciar el efecto inhibitorio del antisentido<sup>21</sup>.

En base a lo anterior, se podría decir que una manera óptima para bloquear un mRNA por medio de antisentido para analizar el efecto que tenga durante el desarrollo, es procurar que se exprese éste en todos los tipos celulares y en cantidades abundantes, lo cual se podría conseguir utilizando el promotor de los genes de RNA ribosomal. Esta técnica

presenta ventajas sobre la recombinación homóloga, ya que esta última es una estrategia lenta, en la cual no basta que haya habido integración del transgene, sino que se requiere seleccionar a las células en las que se haya dado el evento de recombinación homóloga, que ocurre con una frecuencia de 1:100. Si se deseara bloquear varios genes simultáneamente el trabajo se amplificaría, mientras que por medio de antisentidos se podría hacer fácilmente.

Para probar si el promotor de los genes ribosomales funciona para producir suficiente RNA antisentido en las ES, se necesita ensayar con un gene que se exprese abundantemente. Un candidato adecuado es el gene de la fosfatasa alcalina tejido no específica (TN-ALP), ya que se expresa abundantemente y es fácil de medir la actividad de la proteína, lo cual aumenta las posibilidades de poder bloquear cualquier otro gene en caso de que resulte exitoso. En ratón se han descrito tres genes diferentes de fosfatasa alcalina: la isoforma tejido no específica (TN-ALP) que se expresa en las ES (comunicación personal con el Dr. Ramiro Ramírez), la isoforma embrionaria (E-ALP) y la isoforma intestinal (I-ALP). Se sabe que presentan un patrón de expresión específico durante el desarrollo, siendo de particular interés la expresión abundante de la isoforma TN-ALP en las células germinales primordiales, puesto que pudiera estar involucrada en la determinación de tales células. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce su función, lo que aumenta el interés en utilizar este gene como modelo de ensayo pues se podría analizar el efecto de la ausencia de fosfatasa alcalina en la proliferación o diferenciación de las ES.

Respecto a la manipulación celular, aún hay sistemas de diferenciación mejor caracterizados para las células EC que para las ES. La inducción de la diferenciación hacia la línea muscular en respuesta a DMSO y hacia el linaje neuronal por inducción con ácido retinoico (RA), son los sistemas mejor caracterizados. Se ha demostrado que ninguna de las dos drogas son tóxicas para las EC a las concentraciones utilizadas para inducir diferenciación<sup>31,32</sup>, indicando que su efecto es inducción y no selección de células diferenciadas que preexistían en el cultivo. Las dos drogas inducen diferenciación afectando diferentes blancos celulares, ya que mutantes que ya no pueden responder a una droga continúan diferenciando en respuesta a la otra droga<sup>33</sup>. La inducción con RA es de particular interés debido a su relevancia durante el desarrollo. El RA es una molécula biológica que participa en diferentes momentos de el desarrollo embrionario, como se ha visto durante la formación de las alas del pollo<sup>34</sup> donde se le ha considerado como morfógeno, durante el desarrollo craneofacial<sup>35</sup> y del sistema nervioso central<sup>36</sup> del mamífero; tiene una familia de receptores que funcionan como factores transcripcionales inducibles por ligando, lo que los convierte en candidatos para participar en la regulación genética durante la diferenciación y el desarrollo<sup>37</sup>. Un ejemplo de ello es la regulación específica que ejercen sobre genes homeóticos, de acuerdo a patrones restringidos temporal y espacialmente; los genes homeóticos son también factores transcripcionales cuya expresión está regulada durante el desarrollo en todos los vertebrados y parecen tener un papel en la especificación de las identidades regionales a lo largo de los principales ejes embrionarios<sup>38</sup>.

Considerando las semejanzas entre las células ES y las EC mencionadas anteriormente, en este trabajo se propone extrapolar los protocolos descritos para inducir la diferenciación de las EC a los cultivos de ES, lo que nos permitirá contar con un modelo para estudiar el proceso de diferenciación celular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer los sistemas para manipular a las células ES tanto a nivel molecular, bloqueando la expresión de genes endógenos a través de transcritos antisentido, como a nivel celular induciendo que diferencien hacia tipos celulares específicos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

### **A) Nivel Molecular.**

Probar la funcionalidad del promotor de los genes RNA ribosomales para producir un RNA antisentido capaz de bloquear la expresión del gene de la fosfatasa alcalina tejido no específica (TN-ALP), que se expresa abundantemente en las ES.

### **B) Nivel Celular.**

Se propone extrapolar los protocolos establecidos para inducir la diferenciación de las EC hacia el linaje neuronal en presencia de ácido retinoico (RA) y hacia el linaje muscular en presencia de DMSO<sup>12</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### I. Cultivo de células ES.

#### *Medios y Soluciones.*

- a) DMEM Cat. 430-2100EB: para 1 litro
- Medir 950 ml H<sub>2</sub>O tridestilada.
  - Disolver el medio y enjuagar la bolsa con un poco de agua para recuperar las trazas.
  - Agregar 3.7g de NaHCO<sub>3</sub> y en cuanto se disuelva ajustar el pH a 6.9 con aprox. 6 ml HCl 1N (preparado con H<sub>2</sub>O tridestilada).
  - Esterilizar inmediatamente por filtración.
  - Guardar a 4°C con parafilm.
- \* No se debe agitar demasiado con el bicarbonato porque reacciona con el aire; el pH se ajusta 0.3 unidades abajo del pH de uso porque sube al filtrarse.
- b) Suero Bovino Fetal (SBF) marca DULBECO:
- Inactivar calentando a 56°C 30 min.
  - Hacer alicuotas y guardar a -20°C.
- c) β-mercapto etanol (βME) 100X (10 mM): para 25 ml
- 4.54 ml de βME 155 mM (grado cultivo DULBECO)  
20.46 ml PBS 1X
- d) GPS 100X: para 50 ml
- 150 mg Penicilina grado cultivo  
250 mg Streptomicina grado cultivo
- disolver en 50 ml H<sub>2</sub>O tridestilada y con esta solución resuspender 200 mM Glutamina (liofilizada DULBECO).
  - Esterilizar por filtración.
- e) PBS: para 1 litro
- 8g NaCl  
0.2g KCl  
0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0.815g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro
- Esterilizar por filtración
- f) Tripsina 0.25%:
- se disuelve en Versene\* (DULBECO) a partir de un stock 2.5% en H<sub>2</sub>O tridestilada.
- g) Medio M15
- |               |        |
|---------------|--------|
|               | final  |
| 500 ml DMEM   |        |
| 75 ml SBF     | 15%    |
| 5 ml βME 100X | 100 mM |
| 5 ml GPS 100X |        |

#### *Para subcultivar células:*

- Cambiar el medio 3-4 horas antes de subcultivar.

- Aspirar el medio y lavar dos veces con PBS.
- Añadir 0.5 ml de tripsina 0.25% para una caja de 6 cm de diámetro (lo mínimo necesario para cubrir la superficie) e incubar 10 min. a 37°C.
- Agregar M15 (2 ml/3 cm; 4.5 ml/6 cm) y dispersar las células pipeteando. Es importante conocer el volumen final para contar la cantidad de células totales. Tomar una alícuota de 10  $\mu$ l y contar en una cámara de Neubauer.
- Centrifugar 5 min a 1000 rpm.
- Resuspender en M15 y sembrar alrededor de  $1 \times 10^6$  células/caja 6 cm en 4 ml M15.
- Cambiar el medio cada vez que se acidifique, sin dejar que se ponga amarillo: a partir del segundo día es diario.

## II. Cultivo de células STO (G418<sup>r</sup> SNL76/7).

### *Medios y Soluciones*

#### a) Medio STO:

- 460 ml DMEM
- 35 ml SBF (7% final)
- 5 ml GPS 100X

#### b) PBS

#### c) Tripsina 0.25%

#### d) Mitomicina 0.5mg/ml:

- Disolver 2 mg (lo que viene el frasco Böhrenger) en 4 ml PBS.

#### \* Usar guantes y cubrir boca porque es muy tóxico.

#### e) Gelatina 0.1%:

- diluir con H<sub>2</sub>O tridestilada del stock 1%: disolver calentando 0.5g gelatina grado cultivo en 100 ml H<sub>2</sub>O tridestilada.
- Esterilizar en autoclave.

### *Para subcultivar las células*

- Quitar el medio sin raspar las células.
- Lavar 2X con PBS.
- Agregar 0.5 ml tripsina 0.25% a un frasco de 75 cm<sup>2</sup> o caja de 10 cm diámetro. Repartir la tripsina por toda la superficie moviendo el frasco.
- Cuando las células se empiecen a desprender agregar 4.5 ml medio y dispersar las células pipeteando.
- Pasar a un tubo estéril y tomar una alícuota para contar las células.
- Centrifugar 5 min. a 1000 rpm.
- Tirar el sobrenadante y resuspender en medio STO para sembrar alrededor de 400 000 células en un frasco de 75cm<sup>2</sup>, o bien sembrar 1/20 para mantener la línea.

### *Para preparar la monocapa de "feeders"*

- Cubrir las cajas de cultivo con gelatina 0.1%; esparcirla bien por toda la superficie e incubar mínimo 2 horas a temperatura ambiente. Aspirar la gelatina antes de sembrar las células.
- Crecer las células STO a confluencia en cajas de 10 cm con 10 ml medio.

- Agregar 1/50 vol. (200 ml) de mitomicina 0.5 mg/ml (50X) para inactivarlas mitóticamente. La concentración final de mitomicina debe ser 10 µg/ml. Incubar 2 horas con la droga.
- Aspirar el medio y lavar 2X con PBS para eliminar la mitomicina.
- Agregar 0.5 ml de tripsina 0.25% y esperar a que se empiecen a despegar.
- Añadir 4.5 ml de medio y resuspender las células pipeteando vigorosamente. Juntar las células de hasta 5 cajas en un tubo estéril de 50 ml.
- Lavar las cajas con medio nuevamente para recuperar todas las células y centrifugar 5 min a 1000 rpm.
- Tirar el sobrenadante y resuspender en 10 ml medio. Tomar una alícuota y contar el número de células para diluirlas a  $3.5 \times 10^5$  células/ml. Sembrar alícuotas de las células "feeder" en cajas gelatinizadas de acuerdo a la siguiente relación:
 

12 ml	para caja	10 cm	diámetro
4 ml	"	"	6 cm diámetro
2 ml	"	"	3 cm diámetro
0.5 ml	"	"	24 o 4 pozos
- Incubar toda la noche para que las células se adhieran antes de usarse.
- Cambiar el medio para eliminar las células muertas.
- \* Puede permanecer hasta un mes en la incubadora pero deben revisarse bajo el microscopio antes de usarse para verificar que la monocapa está intacta.

### III. Congelación y Descongelación de Células.

#### *Medio y Soluciones.*

- a) Medio para Congelar 2X: para 25 ml      final
- |                         |     |
|-------------------------|-----|
| 15 ml DMEM              | 60% |
| 5 ml DMSO grado cultivo | 20% |
| 5 ml SBF                | 20% |
- b) PBS
- c) Tripsina 0.25%
- d) Medio de cultivo (M15 o medio STO)

#### *Para congelar las células:*

- Disociar las células con tripsina 0.25% 10 min a 37°C.
- Inactivar a la tripsina con 1 vol. de medio y disgregar las células pipeteando vigorosamente para desagregar las colonias. Verificar bajo el microscopio que no haya grumos.
- Tomar una alícuota y contar las células.
- Centrifugar las células 5 min a 1000 rpm.
- Resuspender en la mitad del volumen requerido para obtener una densidad de  $5 \times 10^6$ - $10^7$  células/ml.
- Agregar gradualmente un vol. de medio para congelar 2X mientras se agita el tubo.
- Rápidamente alícuotar en tubos de congelación (0.25-0.5 ml/tubo) y poner a -70°C durante 24 horas.
- Transferir los tubos al contenedor de Nitrógeno líquido.

*Para descongelar células:*

- Transferir el vial conteniendo las células congeladas a un baño a 37°C.
- Cuando se descongelen, transferir a un tubo estéril y agregar 5 vol. medio agitando el tubo.
- Centrifugar 5 min. a 1000 rpm.
- Quitar el sobrenadante y resuspender en 2 ml de medio, agitando mucho para evitar la presencia de grumos.
- Sembrar los 2 ml de células en una caja de 3 cm diámetro con células "feeder".
- Incubar a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

**IV. Transfección de células ES.***Medios y Soluciones*

- a) Plásmido linearizado
- b) M15
- c) Tripsina 0.25%
- d) PBS
- e) Etanol 70%
- f) DOTAP (Boehringer)
- g) OPTIMEM (GIBCO-DULBECO)
- h) G418 100X:
  - disolver 18mg de ingrediente activo (cada frasco indica la fracción activa por mg) en 1ml de PBS.
  - Esterilizar por filtración.
  - Almacenar a 4°C.

*Para electroporar (día 1).***A) Preparación del DNA.**

- Para hacer las construcciones se siguieron los protocolos descritos<sup>39</sup>.
- Purificar el plásmido a gran escala, precipitando con PEG para eliminar el RNA que inhibe la eficiencia de transfección.
- Digerir 200 µg del vector con la enzima requerida para linearizarlo. Comprobar la digestión en un minigel.
- Limpiar el DNA con extracción fenol/CHCl<sub>3</sub>; CHCl<sub>3</sub>.
- Precipitar con 1/10 vol. NaCl 5M y etanol absoluto.
- Resuspender en TE 0.1X estéril y ajustar la concentración a 1µg/µl.

**B) Preparación de las células.**

- Un día antes de la electroporación subcultivar las ES (80% confluyente) sembrándolas en proporción 1:2.
- Cambiar el medio 4 horas antes de la electroporación.
- Lavar el medio con PBS y levantar las células con tripsina 0.25%.
- Inactivar con 5 vol. medio y disgregar pipeteando.
- Centrifugar 5 min. a 1000 rpm.
- Resuspender en PBS y contar el número de células.
- Centrifugar las células y resuspender en PBS a una densidad final de 11X10<sup>6</sup> células/ml.

**C) Electroporación en aparato Hoefer.**

- Mezclar 25  $\mu\text{g}$  del DNA con 0.8 ml de células en una cubeta de electroporación.
- Incubar 5 min. a temperatura ambiente. Mientrass:
- Limpiar con etanol 70% los electrodos y la cámara en la campana.
- Introducir los electrodos en la cubeta. colocar ésta en la cámara, cerrarla y conectarla al electroporador.
- Ajustar el voltaje a 230 mV y el capacitor a 490 $\mu\text{FD}$ . El intervalo de descarga se fija a 1.000 mseg.
- Oprimir el botón rojo (iniciar). debe sonar un tono, prenderse el foco "cargar", luego "descarga" y cuando se prende el foco "ready" desconectar la cámara y trasladarla a la campana.
- Retirar la cubeta, dejar 5 min a temperatura ambiente y sembrar:
  - 0.8 ml en caja 10 cm
  - 0.2 ml en caja 3 cm
- Dejar recuperando 24 horas antes de agregar M15 con G418 0.18 mg/ml final.

### Para lipofectar (día 1).

#### A) Preparar conjugado DOTAP:DNA

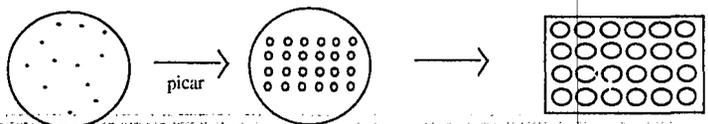
- 30  $\mu\text{l}$  DOTAP
- 5  $\mu\text{g}$  DNA
- aforar a 200  $\mu\text{l}$  con OPTIMEM
- incubar 15 min. a temperatura ambiente.
- Colectar las células tripsinizando, como si se fueran a subcultivar.
- Centrifugar alícuotas de  $10^5$  células por tubo.
- Resuspender en 800  $\mu\text{l}$  de OPTIMEM
- Agregar los 200  $\mu\text{l}$  y pasar a un tubo eppendorf.
- Incubar 4 horas en agitación a 37°C.
- Cambiar el medio y poner M15 para que se recuperen.
- A las 24 horas agregar M15 con G418 0.18 mg/ml final.

### Para seleccionar colonias recombinantes (día 3-10 u 11)

- Se tardan entre 4 y 5 días en morir las células con G418. Cambiar el medio conforme se vaya acidificando hasta que desaparezcan los restos celulares y se vean colonias resistente a neomicina a simple vista.

### Para expandir las colonias (día 11-12).

- Lavar las cajitas 2 veces con PBS; dejar PBS cubriendo las células.
- Poner gotitas de tripsina en la tapa de una caja de 10 cm en un arreglo como cajas de 24 pozos, como se muestra en el siguiente esquema.



colonias resistentes

gotita tripsina en arreglo caja 24 pozos

sembrar sobre "feeders"

- Bajo el microscopio tomar cada colonia con una pipeta puesta máximo en 10  $\mu$ l; en ocasiones es necesario despegar mecánicamente la colonia de los alrededores. Transferir la colonia a la gotita de tripsina.
- Incubar 10'-15' a 37°C.
- Quitar el medio STO de una caja de 24 pozos con "feeders" y poner M15.
- Agregar 20  $\mu$ l de M15 de cada pozo a cada gotita y disgregar la colonia pipeteando.
- Transferir la suspensión de ES a la caja de 24 pozos con "feeder".

#### *Para analizar las colonias (día 16 ó 17)*

- Cambiar el medio 3-4 horas antes.
- Tripsinizar
- Resuspender y tomar 50% para congelar, 10% subcultivar y 40% cuantificar actividad ALP.

### **V. Cuantificación espectrométrica de la actividad total de ALP.**

#### *Soluciones*

- a) Formol 4% en PBS
- b) PBS
- c) Para-nitro-fenol-fosfato (PNPP) 100mg/ml en H<sub>2</sub>O.
- d) Buffer ALP: Tris 10 mM pH 9.5  
MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM
- e) EDTA 0.25 M pH 8

#### *Procedimiento*

- Resuspender células en formol 4% en PBS para fijarlas e incubar 15 min.
- Lavar 2 veces: centrifugar 5' a 1000 rpm.  
resuspender en PBS
- Centrifugar y contar el número de células.
- Resuspender en buffer ALP a una densidad de 6X10<sup>5</sup> células/ml.
- Preparar las diluciones celulares aforando a 495  $\mu$ l con buffer ALP en una cubeta para leer en el espectro.
- Agregar 5  $\mu$ l de PNPP a cada dilución con un intervalo de 10 seg entre cada muestra. Dar vortex. Incubar a temperatura ambiente protegido de la luz.
- A los 15 min exactamente parar la reacción con 500  $\mu$ l de EDTA 0.25M a cada cubeta (con 10 seg de intervalo entre cada cubeta); dar vortex.
- Leer inmediatamente la densidad óptica a 405 nm.

### **VI. Purificación de ALP.**

#### *Soluciones*

- a) PBS
- b) Buffer ALP
- c) Buffer ALP+Tritón X-100 1%

- d) Acetona
- e) Butanol saturado frío.

### *Procedimiento*

- Recolectar las células tripsinizando.
- Resuspender en 1 ml PBS y pasar a tubo eppendorf.
- Centrifugar 5' a 1500 rpm.
- Resuspender en 0.5 ml de buffer ALP y homogeneizar (con un homogeneizador para eppendorf).
- Centrifugar 10' a 3500 rpm para eliminar los núcleos.
- Tomar el sobrenadante y pasarlo a un tubo nuevo.
- Centrifugar 15' a 12,250 rpm para eliminar los organelos.
- Tirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 µl de buffer ALP+Tritón 1%.
- Agregar 100 µl de butanol saturado y agitar vigorosamente 30'.
- Centrifugar 30' a v.max. en microfuga.
- Tomar la fase acuosa (que queda abajo) y pasarla a tubo nuevo.
- Precipitar con acetona y centrifugar 1 hora a v.max. en microfuga.
- Resuspender la pastilla en Buffer ALP.

## **VII. Detección de actividad de ALP en gel acrilamida 6%.**

### *Soluciones*

- a) Buffer A: para 100 ml      final  
     18.17 g Tris              1.5M  
     4 ml SDS 10%              0.4%  
     - Disolver en 80 ml H<sub>2</sub>O  
     - Ajustar el pH a 8.8 con aprox. 2.5 ml de HCl concentrado.  
     - Aforar a 100 ml.
- b) Buffer B: para 100 ml      final  
     6.06 g Tris                0.5M  
     4 ml SDS 10%              0.4%  
     - Disolver en 80 ml H<sub>2</sub>O.  
     - Ajustar el pH a 6.8 con aprox. 4.4 ml de HCl concentrado.  
     - Aforar a 100 ml.
- c) Acrilamida 30%: para 165 ml  
     50 g acrilamida  
     1.32 g bisacrilamida (0.8% final)  
     - Disolver en H<sub>2</sub>O aforando a 165 ml
- d) Temed
- e) Persulfato de amonio 10%.  
     - Se disuelve en agua.
- f) Buffer ALP
- g) Fenilalanina 25 mM:  
     - Disolver 200 mg en 50 ml de buffer ALP.

h) Levamisol 1 mM:

- Disolver 12 mg en 50 ml de buffer ALP

i) Buffer para cargar la muestra: para 10 ml

1.25 ml buffer B

100  $\mu$ l SDS 10%

1 ml glicerol

una "pizca" de azul de bromofenol

- Aforar con H<sub>2</sub>O

j) BCIP:

Disolver 16.5 mg en 1 ml de buffer ALP (o dimetil formamida si es la sal no soluble en agua).

*Para hacer el gel*

Gel separador: para 24 ml

Buffer A	6 ml
Acrilamida 30%	4.8 ml
H <sub>2</sub> O	13.2 ml
Temed	20 $\mu$ l
Persulfato 10%	200 $\mu$ l

Gel concentrador: para 10 ml

Buffer B	2.52 ml
Acrilamida 30%	1.32 ml
H <sub>2</sub> O	6 ml
Temed	10 $\mu$ l
Persulfato 10%	50 $\mu$ l

-Cargar las muestras por triplicado con el buffer para cargar sin calentar, porque la TN-ALP es sensible a la temperatura.

- Correr 3-4 horas a 100 volts. (No se corre a corriente constante porque se calienta el gel y las muestras se desnaturalizan).

- Incubar el gel 1 hora a temperatura ambiente en la solución con el inhibidor (Phe o levamisol) y al control en buffer ALP solo.

- Agregar 0.5 ml de BCIP a cada gel, proteger de la luz e incubar toda la noche a 37°C.

\* La protefna debe ser purificada para que en el gel no salga un barrido.

### VIII. Purificación de RNA eliminando completamente al DNA.

*Soluciones*

a) Urea 6M/LiCl 3M.

b) Sol. D:

Tiocianato de Guanidina 4M	23.632g
Citrato de Sodio 25mM pH 7	1.25 ml de stock 1M
Sarcocil 0.5%	2.5 ml de stock 10%
H <sub>2</sub> O	28 ml

para 50 ml

c) Etanol 95%

d) Acetato de Sodio 2M pH 4

e) Fenol saturado con H<sub>2</sub>O

f) Cloroformo:isoamflico 24:1

g) Isopropanol

h) DNAsa libre de RNAsa

i) Etanol 70%

### Procedimiento

- Lisar las células en sol. urea/LiCl dando vortex ( $2 \times 10^6$  células/ml sol.).
- Precipitar a  $-70^\circ\text{C}$  mínimo 4 horas.
- Centrifugar  $10'$  a  $4^\circ\text{C}$ , inmediatamente tirar el sobrenadante (donde está el DNA ya que el LiCl precipita preferencialmente el RNA). Con un papel absorbente eliminar el exceso de líquido.
- Resuspender la pastilla en  $500\mu\text{l}$  de sol. D.
- Agregar  $150\mu\text{l}$  de etanol 95% e incubar en hielo  $5'$ .
- Centrifugar  $15'$  a  $4^\circ\text{C}$ , tirar el sobrenadante. (Esta precipitación rápida elimina DNA ya que requiere de más tiempo que el RNA para precipitar<sup>40</sup>).
- Resuspender en  $500\mu\text{l}$  de sol. D y agregar  $50\mu\text{l}$  (1/10 vol.) de NaAc 2M; vortex.
- Extraer con  $500\mu\text{l}$  (1 vol.) fenol saturado con agua +  $100\mu\text{l}$  (1/5 vol.) cloroformo:isoamílico.
- Dejar  $15'$  en hielo para que se formen las dos fases.
- Centrifugar  $20'$  en frío.
- Pasar fase acuosa a tubo nuevo y precipitar con  $500\mu\text{l}$  (1 vol.) de isopropanol.
- Incubar  $30'$  a  $-20^\circ\text{C}$ . (Tiempos más largos aumentan la contaminación con DNA).
- Centrifugar  $20'$  a  $4^\circ\text{C}$ .
- Resuspender la pastilla en  $25\mu\text{l}$  agua.
- Añadir  $1\mu\text{l}$  DNasa libre de RNasa e incubar  $15'$  a  $37^\circ\text{C}$ . (No es necesario agregar buffer para DNasa, incluso han visto que baja el rendimiento de RNA por actividad remanente de RNasa en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ )
- Agregar  $225\mu\text{l}$  (10 vol.) sol. D (Es suficiente para eliminar completamente la actividad de DNasa, no es necesario volver a extraer).
- Precipitar con  $250\mu\text{l}$  (1 vol.) de isopropanol de  $30'$  a 1 hora a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Centrifugar  $10'$  en frío; lavar la pastilla con etanol 70% frío.
- Resuspender en  $25\mu\text{l}$  agua y cuantificar en el espectro  $1\text{OD}=40\mu\text{g}$ .

## IX. RT-PCR

### A) Transcriptasa Reversa

Para  $50\mu\text{l}$  de reacción:

- x  $\mu\text{l}$  RNA ( $10\mu\text{g}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  oligodT ( $\mu\text{g}$ )
  - calentar  $5'$  a  $65^\circ\text{C}$ , mientras mezclar:
- 10  $\mu\text{l}$  buffer RT 5X
- 2  $\mu\text{l}$  dNTP's 5mM (200 $\mu\text{M}$  final)
- 2  $\mu\text{l}$  DTT 0.1M (10mM final)
- y  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- 0.5  $\mu\text{l}$  transcriptasa reversa BRL.

**B) PCR**

Para 50µl de reacción:

x µl H<sub>2</sub>O

5 µl de cDNA

5 µl buffer taq 10X

2 µl dNTP's 5mM

y µl oligos (30 pmol de cada uno)

1 µl Perfect Match\* (Stratagene)

- calentar 3' a 95°C y agregar

0.5 µl taq Böheringer

**C) Gel agarosa 3%**

- Disolver 1.5 g de agarosa en 50 ml TBE 0.5X

- Agregar bromuro de etidio 30 mg/ml final antes de vaciar.

- Correr en TBE 0.5X conteniendo bromuro de etidio 30 mg/ml a 260V.

**D) Secuencia de los oligos utilizados**

Para distinguir los transcritos sentido, antisentido y endógeno:

oligo a (TNa): 5' AGC GCA GGA TGG ATG TGA CC 3'

oligo b (TNb): 5' CCT TAA GGG CCA GCT ACA CC 3'

oligo u (universal-merino): 5' GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'

Para detectar la isoforma embrionaria:

oligo E-ALP3': 5' GCC CGG GCT CAC TGC ACT GC 3'

oligo E-ALP5': 5' CGC ACC AGT GAG CAG GAC ACG 3'

Para detectar la isoforma intestinal:

oligo I-ALP3': 5' GCT GGA ACC CCA GAC CCC GAG 3'

oligo I-ALP5': 5' GGC CCT CTC GAT GGC TAA GCT G 5'

Para detectar HPRT:

oligo H1: 5' CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACT 3'

oligo H2: 5' GTC AAG GGC ATA TCC AAC AAC AAA C 3'

**X. Inducción de la diferenciación formando agregados.****Soluciones.**

a) DMSO grado cultivo

b) Stock RA 10 mM en etanol 95%.

c) M15

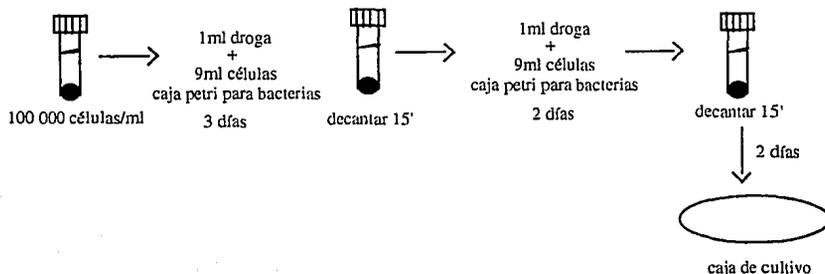
d) PBS

e) Tripsina 0.25%

**Procedimiento**

Recolectar las células tripsinizando y llevarlas a una densidad de 10<sup>5</sup> células/ml de M15.

- Prepara las diluciones requeridas de la droga, ya sea DMSO o RA en 1 ml de M15 (ej. 100  $\mu$ l RA 10  $\mu$ M + 900  $\mu$ l M15) y ponerlo en caja petri para cultivar bacterias de 10 cm de diámetro.
- Tomar 9 ml de la dilución celular y sembrarlos sobre la caja con el ml de droga.
- A los 3 días subcultivar:
  - Aspirar el medio con las células (formando pequeños grumos) y dejar 15' decantar en tubo estéril de 15 ml.
  - Preparar las cajas petri para bacteria con 1 ml M15+droga.
  - Quitar el sobrenadante y resuspender en 9 ml M15 y sembrar sobre el ml de droga preparado.
- A los 2 días volver a subcultivar.
- Dos días después sembrar los agregados sobre caja de cultivo para que se puedan adherir:
  - Aspirar el medio con las células (formando pequeños grumos) y dejar 15' decantar en tubo estéril de 15 ml.
  - Quitar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de M15; sembrar en caja de cultivo de 10 cm de diámetro.
- Cambiar el medio conforme se vaya acidificando. A partir de los 4 días aparecen células diferenciadas.



## RESULTADOS

### A) Manipulación de las ES a nivel molecular.

#### *A.I. Construcción de los vectores para expresar el RNA antisentido de ALP a partir del promotor del gene RNA ribosomal.*

Para bloquear la expresión de TN-ALP en las ES se construyó un plásmido que transcribe RNA antisentido complementario al mRNA de TN-ALP a partir de un fragmento funcional del promotor de los genes RNA ribosomales<sup>41</sup>, en el cual se unió el promotor con un fragmento (711 pb) de la región 5' del cDNA de TN-ALP en orientación 3'-5' (pALPas); paralelamente se construyó el plásmido pALPs que transcribe RNA sentido para utilizarse como control. En la figura 1 se presenta un esquema de la estrategia de las construcciones.

En un principio se consideró analizar la funcionalidad de las construcciones en experimentos de expresión transitoria, para lo cual se estimó la eficiencia de transfección. Se electroporó el plásmido pCH110, que expresa  $\beta$ -galactosidasa bajo el control del promotor de SV40, y en el mejor de los casos el número de células azules no superaba el 1% (ver más adelante). Con esta eficiencia no era posible detectar una disminución en la actividad de ALP debida a la producción de antisentido en las células transfectadas con el plásmido pALPas. En consecuencia, hubo la necesidad de introducir un cassette que confiere resistencia a neomicina para seleccionar las colonias recombinantes y cuantificar la actividad de ALP en células con expresión estable. Para insertar el cassette Neo a los plásmidos pALPs y pALPas se siguió la estrategia esquematizada en la figura 2.

#### *A.II. Transfección y selección de colonias con expresión estable de las construcciones.*

Para optimizar la eficiencia de la transfección se compararon los métodos de electroporación y lipofección.

##### *a) Electroporación.*

Para montar las condiciones de electroporación se compararon 2 marcas de electroporador: Bio-Rad y Hoefer. Para el caso del electroporador Hoefer se varió el voltaje entre 230V y 280V y el intervalo de descarga, siendo el mejor  $t=1.000$ , manteniendo la capacitancia constante en 290 $\mu$ F. Con el electroporador Bio-Rad se utilizaron las condiciones reportadas<sup>19</sup>: 230V, 500 $\mu$ F y 180 amperes. Se electroporó el plásmido pCH110 para comparar las eficiencias de los métodos entre sí, como se muestra en la tabla 1.

##### *b) Lipofección.*

El principio de la lipofección se basa en establecer un conjugado de lípidos con DNA que resulta permeable a las células. Se probaron 2 marcas de lípidos: DOTAP de Boehringer y LIPOFECTINA de GIBCO-BRL. Se variaron las relaciones DNA:lípido, el tiempo de incubación de las células con el conjugado y el medio de incubación. Las condiciones óptimas fueron con una relación 1:6 de DNA:DOTAP incubando en OPTIMEM\* 4 horas en

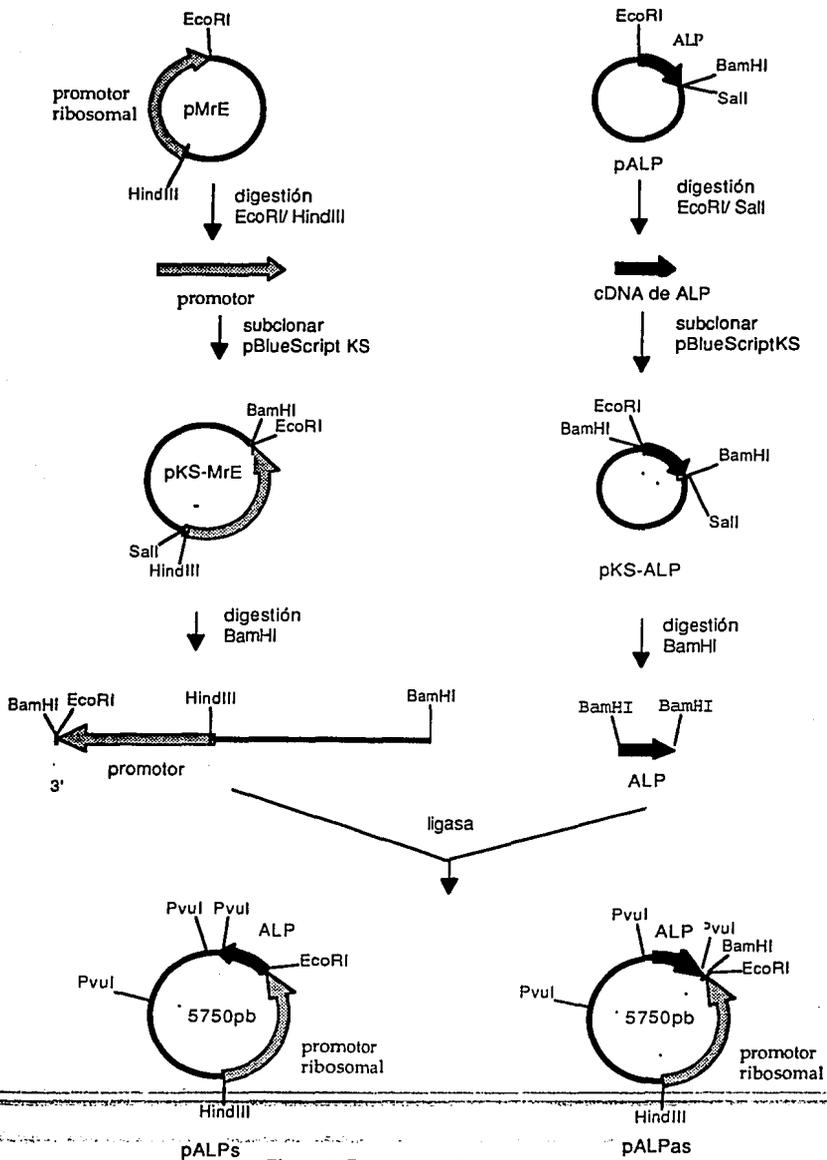
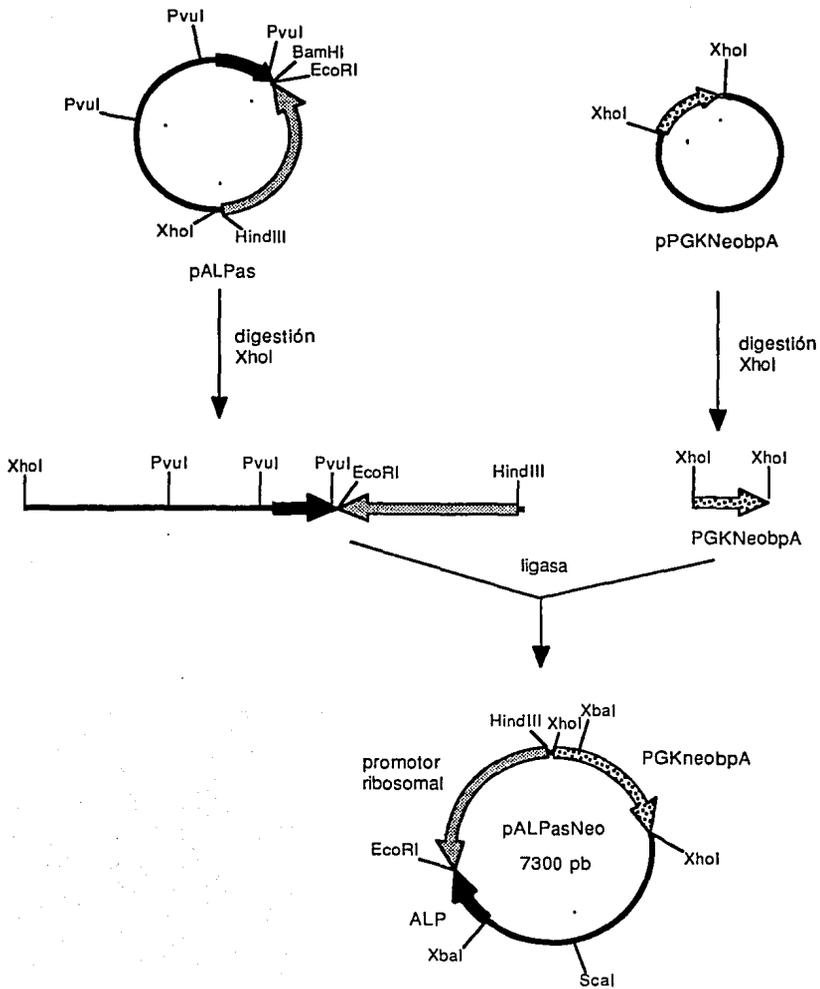
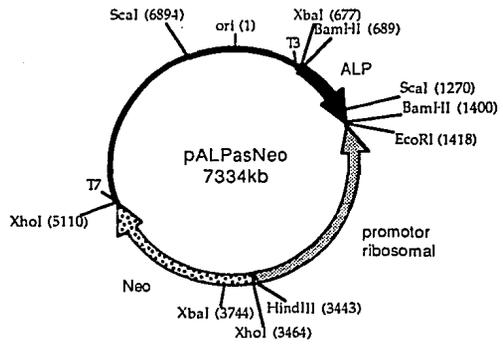
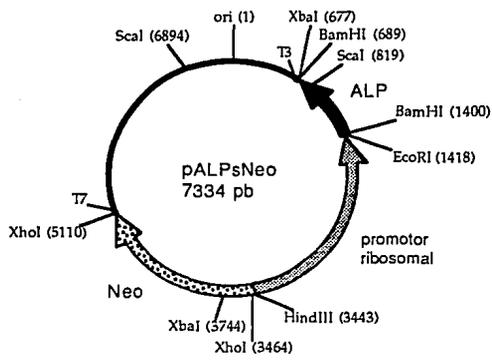


Figura 1. Estrategia de las construcciones.



**Figura 2.** Estrategia para insertar el cassette PGKneoBP, que contiene resistencia a neomicina bajo el control del promotor PGK. El mapa se muestra en la figura 3.



**Figura 3. Mapa de los plásmidos transfectados pALPsNeo y pALPasNeo. ALP, fragmento de 711pb del cDNA de TN-ALP; Neo, cassette PGKneobpA. El sentido de las flechas indican la dirección de la transcripción.**

agitación (ver material y métodos). La lipofectina resultó tóxica para las células de manera que las lipofecciones se realizaron con DOTAP. En la tabla 1 se resumen los resultados.

Método	Relación DNA:DOTAP	Células Azules	Eficiencia
Electroporación Bio-Rad	-	1 de $1.1 \times 10^7$	-
Electroporación Høeffer	-	2581 de $1.1 \times 10^7$	0.025%
Lipofección en DMEM	1:2 (15µg:30µg)	2 de $4 \times 10^5$	0.0005%
Lipofección en DMEM	1:3 (10µg:30µg)	42 de $4 \times 10^5$	0.01%
Lipofección en DMEM	1:6 (5µg:30µg)	17 de $4 \times 10^5$	0.0004%
Lipofección en DMEM	1:7 (5µg:35µg)	6 de $4 \times 10^5$	0.0015%
Lipofección en OPTIMEM	1:6 (5µg:30µg)	4,573 de $4 \times 10^5$	1.125%

Tabla 1. Optimización de los métodos para transfectar ES con el plásmido pCH110.

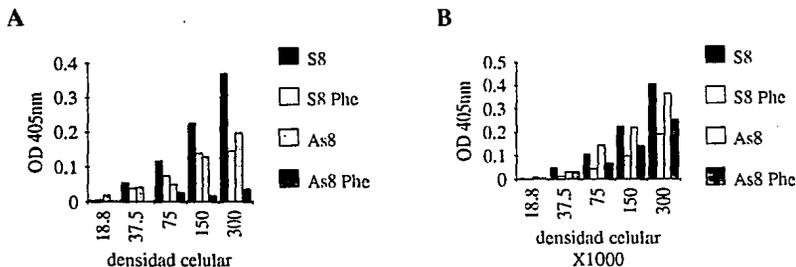
Con las condiciones óptimas se transfectaron los plásmidos pALPasNeo (colonias As) y pALPsNeo (colonias S) tanto por lipofección como electroporación. En la figura 3 se muestra el mapa de los plásmidos.

### III. Cuantificación de la actividad de ALP en una muestra de las colonias transfectadas.

Puesto que ALP se encuentra en la membrana plasmática se puede cuantificar su actividad en células enteras, por lo que la cuantificación se hizo analizando diluciones celulares. Se hizo una curva de densidad celular por duplicado analizando una colonia As y una colonia S tomadas al azar; en la colonia As8 hubo un 48% de inhibición de la actividad total de ALP con respecto a la colonia S8, como se muestra en la gráfica 1A.

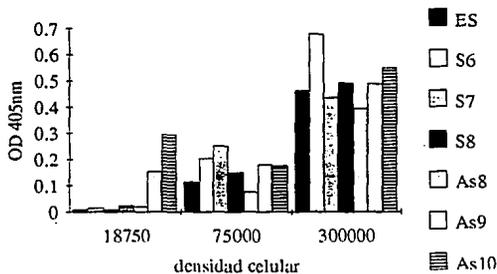
Hay dos posibles explicaciones de que la inhibición no haya sido del 100%, una es que el antisentido no sea 100% eficiente y la otra es que en la actividad total de ALP haya contribución de otras proteínas diferentes a la TN-ALP. Aunque en la literatura no se ha descrito y las células EC, que comparten características con las ES, sólo expresan la TN-ALP, hay varias evidencias para pensar que hubiera otra isoforma presente. La primera es en base a la observación en el laboratorio de que las ES siguen presentando actividad de ALP aún después de tratamientos en los que las células germinales primordiales, que también expresan la isoforma TN-ALP, pierden completamente la actividad, además de que se sabe que la isoforma TN-ALP es muy inestable y sensible a la temperatura<sup>42</sup>. La segunda es que en blastocistos, etapa de donde provienen las ES, se expresan tanto la isoforma TN-ALP como la isoforma embrionaria (E-ALP)<sup>43</sup>. Aunque es posible que el gene E-ALP sea expresado por células diferentes a las que expresan el gene TN-ALP, las ES pudieran expresar ambos. La fenilalanina (Phe) es un inhibidor de la isoforma I-ALP<sup>42</sup> y posiblemente de E-ALP, pero no de TN-ALP. Para saber si en las ES existe alguna isoforma sensible a Phe, se cuantificó la actividad total en presencia de 25 mM Phe y efectivamente la actividad

baja alrededor del 50% (gráfica 1A). Al cuantificar la actividad de la colonia As8 en presencia de Phe ésta prácticamente desaparece, lo que sugiere que el transcrito antisentido si está bloqueando la traducción de TN-ALP, pero que la expresión de otro u otros genes contribuyen a la actividad total de ALP. Sin embargo, cuando se repitió la cuantificación en células que llevaba dos subcultivos más, la colonia As8 sólo tuvo una inhibición del 11% respecto al control y en presencia de Phe disminuyó sólo un 41% en lugar de bajar a casi cero como en la medición anterior (gráfica 1B).



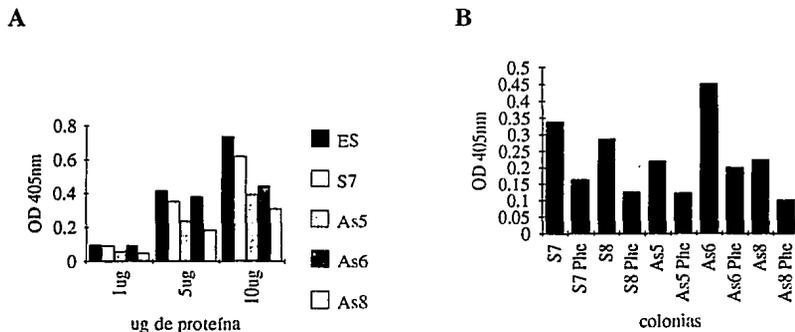
Gráfica 1. Cuantificación espectrométrica de la actividad total de ALP. Panel A, Las células llevaban tres subcultivos; panel B, las células llevaban 5 subcultivos.

Considerando que la inestabilidad del fenotipo fuera una particularidad de la colonia As8, se amplió el análisis con otras colonias, de las que se hizo una curva de actividad normalizando por  $\mu\text{g}$  de proteína; sólo la colonia As11 pareció tener menos actividad de ALP, aunque únicamente del 8% respecto a las células sin transfectar (datos no mostrados). Se repitió la cuantificación de la colonia As8 que había tenido menor actividad (gráfica 1A), junto con otras colonias recién descongeladas. En este experimento nuevamente sólo la colonia As8 tuvo menor actividad que los controles, pero la disminución fue únicamente del 15%, como se muestra en la gráfica 2.



Gráfica 2. Cuantificación espectrométrica de la actividad total de ALP en colonias recién descongeladas, excepto As8 que lleva 8 subcultivos.

El hecho de que la colonia S6 tenga más actividad que las células sin transfectar no puede deberse a una contribución por parte del transgene, puesto que el transcrito es producido por la RNA polimerasa I y en principio no debiera traducirse. Una observación interesante es que la colonia As8 proliferaba más lento que las demás colonias durante los primeros subcultivos, tardándose 2 días más en llegar a confluencia. Esta lentitud de crecimiento fue disminuyendo con cada pase de tal forma que al momento del experimento de la gráfica 2, en el cual ya había acumulado 8 subcultivos, proliferaba a una velocidad comparable con las demás colonias. Considerando la posibilidad de que la disminución de ALP fuera desventajosa para las células, sería posible que se estuvieran seleccionando aquellas que lograran superar el bloqueo de la expresión de TN-ALP, ya sea expresando otra isoforma, por rearreglo de la construcción o algún otro mecanismo. Si este fuera el caso, en células recién descongeladas debería haber mayor inhibición de ALP. Para probar esto se descongeló una alícuota de la colonia As8, así como de otras colonias tanto As como S. Normalizando por cantidad de proteína, en la gráfica 3A se muestra como la colonia As8 recién descongelada tuvo 58% de inhibición de la actividad de ALP, comparable a lo observado inicialmente. Después de dos subcultivos se repitió el experimento (gráfica 3B) y la colonia As8 efectivamente se estaba recuperando, pues la actividad fue sólo 32% menor. Sin embargo, la presencia de Phe en este caso no desapareció la actividad de ALP como se había observado anteriormente.



Gráfica 3. Cuantificación espectrométrica de la actividad total de ALP. Panel A, colonias recién descongeladas; Panel B, colonias después de dos subcultivos en presencia o ausencia de 25 mM Phe.

Para comprobar que la actividad remanente en presencia del antisentido se debe a la participación de otras proteínas, se hicieron gels de proteína para revelar por actividad la presencia de más de una banda. Aunque no se lograron distinguir con claridad varias bandas, se demostró la presencia de una proteína activa (pudieran ser varias proteínas) aún en presencia de levamisol, un inhibidor específico de la isoforma TN-ALP<sup>43</sup> que pudiera ser la isoforma embrionaria (figura 4A).

Para saber si la actividad remanente en el gel con levamisol se debe a la expresión alguno de los genes E-ALP o I-ALP, se utilizaron los oligos descritos<sup>43</sup> para detectar el mRNA por RT-PCR. En la figura 4B se demuestra que efectivamente el gene E-ALP se expresa en las ES además del TN-ALP, mientras que el gene I-ALP no se expresa. Los

**A**

Control

1 2 3 4 5 6 7 8



Phe

1 2 3 4 5 6 7 8

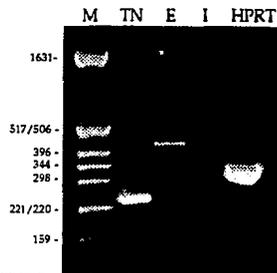


Levamisol

1 2 3 4 5 6 7 8



**Figura 4.** Presencia de otra isoforma de ALP en las ES. Panel A, actividad de ALP aún en presencia de los inhibidores Phe o levamisol en gel de proteína relevado por actividad. 1, isoformas hígado y placenta humanas; 2, CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase); 3, células ES; 4, colonia S7; 5, colonia S8; 6, colonia As5; 7, colonia As6; 8, colonia As8. Panel B, RT-PCR de ES para detectar la expresión de TN-ALP (TN), E-ALP (E) o I-ALP (I); se utilizó HPRT como control.

**B**

oligos utilizados se encuentran en exones diferentes, lo que permite distinguir el producto de amplificación a partir de cDNA respecto al producto amplificable utilizando DNA genómico como templado ver figura 5B y C).

#### ***IV. Determinación por RT-PCR de la expresión del transcrito antisentido en las colonias transfectadas.***

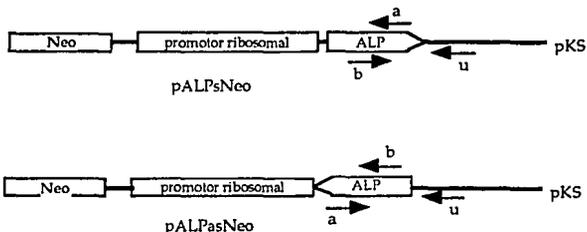
Para averiguar si las colonias que tuvieron menor actividad de ALP en realidad producían el antisentido, se analizó por RT-PCR la expresión de las construcciones en las colonias. Se diseñaron oligos internos al fragmento de cDNA utilizado en la construcción, que en combinación con un oligo universal modificado<sup>44</sup>, nos permite distinguir el transcrito antisentido del sentido y la producción endógena de mRNA de ALP, como se esquematiza en la figura 5A; en la figura 5B se muestra el tamaño de los fragmentos esperados dependiendo del par de oligos utilizado. Se hicieron los controles sobre los plásmidos directamente para comprobar que efectivamente podíamos distinguir el transcrito sentido del antisentido (fig. 5C).

En la figura 6 se muestran varias colonias con expresión de la construcción. En el panel A se presenta la expresión en un grupo de colonias de HPRT, el gene que codifica para la enzima hipoxantil-fosforibosil-transferasa, para demostrar la presencia de cDNA incluso en los casos en que no se detecte expresión de las construcciones. En el panel B se muestra la expresión del antisentido en las colonias que resultaron positivas para HPRT; las colonias As7 y As11 que mostraron una reducción en la actividad de ALP efectivamente transcriben el antisentido, aunque también hay señal en colonias que no disminuyeron la actividad total de ALP. En un segundo grupo se analizó la expresión en la colonia S8 y en las colonias As8, As9 y As10. Como se observa en la figura 6C la colonia As8, que mostró menor actividad de ALP, expresa abundantemente el antisentido, aunque el mensajero de TN-ALP no desaparece.

#### ***V. Análisis de la inserción en el genoma de la construcción completa***

Una explicación de que la efectividad del antisentido se esté perdiendo, podría ser la formación de reanreglos en las construcciones de manera que se pierda parte del promotor; debido a que existen 13 repeticiones en el promotor ribosomal, la frecuencia de recombinación podría aumentar. Por medio de experimento tipo Southern se comprobó que la construcción está completa y en multicopia sólo en la colonia S7 (figura 7). El hecho de que no observe señal en la colonia As8 entre otras, mientras que por RT-PCR se detecta actividad transcripcional, se podría explicar suponiendo que en las colonias hay una población heterogénea donde la mayoría de las células no tiene la construcción funcional, siendo sólo detectable por PCR la minoría que aún expresa el antisentido. Esto podría explicar también porque sólo hay una inhibición parcial de la actividad de ALP, misma que va disminuyendo con el tiempo. La colonia As8 llevaba 8 subcultivos cuando se le extrajo el DNA para este experimento, que es cuando tenía una actividad 15% menor que la colonia

**A**



**B**

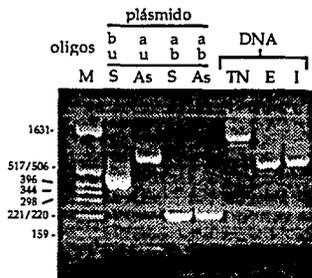
Fragmentos Esperados (pb)

Templado	Par de Oligos	Tamaño
pALPsNeo	b, u	470
pALPasNeo	a, u	646
pALPsNeo pALPasNeo cDNA	a, b	240

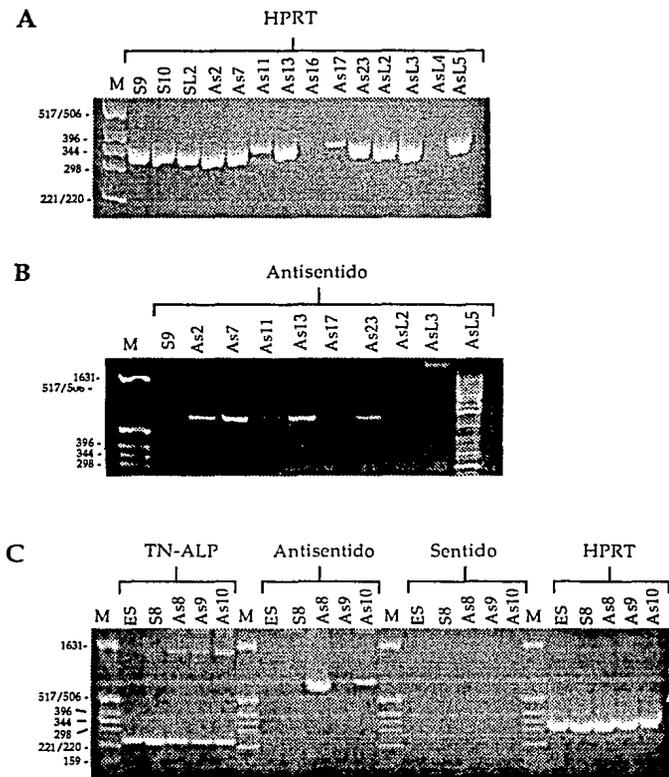
  

Gene	cDNA	DNA
TN-ALP	240	1244
E-ALP	438	638
I-ALP	396	679

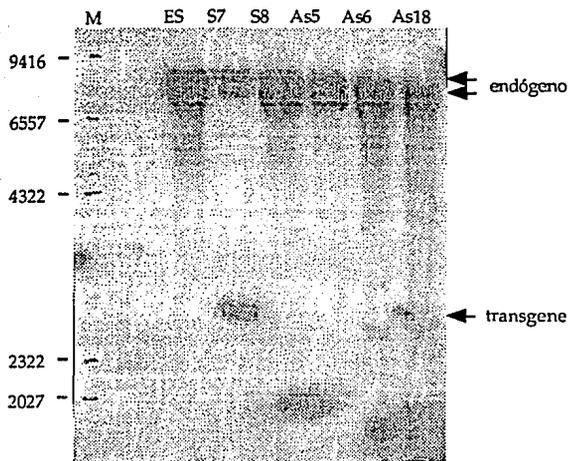
**C**



**Figura 5.** Estrategia para distinguir por PCR la expresión de las construcciones y del mensajero endógeno de ALP en las células transfectadas. Panel A, mapa de los oligos utilizados (secuencia en material y métodos). Panel B, tamaño de los fragmentos esperados según el par de oligos que se utilice. Panel C, PCR a partir de plásmido como control positivo mostrando los diferentes tamaños esperados de acuerdo al par de oligos utilizado; los últimos tres carriles muestran la amplificación específica de los genes TN-ALP (TN), E-ALP (E) e I-ALP (I) a partir de DNA genómico.



**Figura 6.** RT-PCR para detectar expresión de RNA antisense en las colonias transfectadas. **Panel A**, expresión de HPRT como indicativo de la cantidad de cDNA para cada muestra; **panel B**, amplificación de RNA antisense en las colonias que expresaron HPRT en el panel A. **Panel C**, expresión de TN-ALP, transgene antisense, transgene sentido y HPRT en otro grupo de colonias. M, pBR322/Hinfl; ES, células sin transfectar.



**Figura 7.** Southern de DNA genómico digerido con *Xba*I, utilizando como sonda pALPasNeo linealizado con *Xho*I (ver mapa en material y métodos). Se indican las bandas correspondientes al gene TN-ALP endógeno. Sólo la colonia S7 tiene la banda de 2700pb esperada de la construcción. M, pBR322/*Hinf*I. Los tamaños se indican en pb.

control; aunque la colonia S7 llevaba el mismo tiempo de cultivo no existe presión para seleccionar aquellas células que recombinen en el promotor ribosomal.

## B) Manipulación de las ES a nivel celular.

### *1. Inducción de la diferenciación hacia el linaje muscular en presencia de DMSO.*

Se hizo una curva de concentración de DMSO para establecer la concentración óptima para inducir la diferenciación. El rango de concentraciones se eligió considerando que para inducir la diferenciación de las EC se utiliza 1% de DMSO<sup>12</sup>, además de que el Dr. Philippe Brabè (en comunicación personal) observó que concentraciones mayores al 1% resultan letales para las células ES. En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos de un total de 5 experimentos independientes.

Concentración de DMSO	Porcentaje de células diferenciadas
control	<1%
0.05%	<1%
0.075%	<1%
0.1%	<1%
0.5%	<1%
0.75%	10%
1%	30%

Tabla 2. Porcentajes representativos de células diferenciadas por inducción con diferentes concentraciones de DMSO.

Para considerar que hubo diferenciación se comparó la morfología que adquirieron las células con la morfología descrita tanto para músculo esquelético como cardíaco<sup>12</sup>; se consideraron células cardíacas aquellas que latían. El proceso de inducción involucra una primera etapa durante la cual se generan grumos que posteriormente se dejan adherir a una caja de cultivo, donde las células diferenciadas migran fuera del grumo (ver material y métodos). Algunos grumos (aprox. el 10%), sin embargo, no se adhieren a la caja de cultivo y se desarrollan como cuerpos embrionarios. Se encontraron latiendo tanto células adheridas como cuerpos embrionarios. La frecuencia de ambos tipos de células diferenciadas incrementó en presencia de 0.75% - 1% DMSO. El hecho de encontrar células diferenciadas en ausencia de DMSO o a concentraciones bajas (<0.5%) corresponde a la capacidad de las ES a diferenciar en ausencia de células "feeder".

Los eventos de diferenciación fueron independientes, es decir que en la caja de cultivo se observaron varios focos de células latiendo en la monocapa que se iban coordinando conforme aumentaban los días de cultivo, de forma que para el séptimo día de cultivo prácticamente todas las células que latían lo hacían sincronizadamente. La diferenciación hacia músculo esquelético no se comprobó a nivel molecular. En la figura 8 se muestra la morfología típica de las colonias de ES cultivadas sobre una monocapa de "feeders" (panel A), la morfología que adquieren al ser inducidas a formar agregados en

ausencia de droga (panel B), así como la imagen de un grumo que latía y la monocapa formada por células que migraron fuera del grumo (panel C).

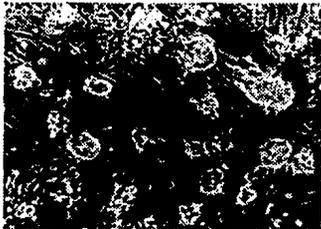
## II. Inducción de la diferenciación hacia el linaje neuronal en presencia de RA.

Aunque estaba reportado que el ácido retinoico (RA) resultaba letal para las células ES<sup>12</sup>, existía el antecedente (Dr. Brabè, comunicación personal) de haber logrado inducir al menos cambios morfológicos semejando neuronas y astrocitos en presencia de concentraciones de RA menores a  $10^{-6}M$ , la concentración utilizada para inducir la diferenciación de las EC<sup>12</sup>. El RA existe en varias conformaciones que se distinguen por la potencia con la cual realizan su actividad biológica y hay una familia de receptores para las diferentes conformaciones<sup>45</sup>. En el caso particular de la inducción de la diferenciación hacia la línea neuronal de las EC las conformaciones *trans*RA han sido mas potentes que la conformación *9-cis* RA, aunque en otros sistemas se ha observado lo contrario<sup>46</sup>. En base a estos antecedentes, decidimos ensayar una curva de concentraciones de *trans*-RA para establecer el rango que mejor funcionara para nuestra línea celular. Encontramos que efectivamente se mueren las células al usar las concentraciones similares e incluso menores a las reportadas. Aunque no se hizo una cuantificación formal de la sobrevivencia, fue notorio que el porcentaje de sobrevivientes aumenta conforme disminuye la concentración y su morfología cambia dramáticamente como se puede ver en la figura 8D, pero no semejan neuronas. En la tabla 3 se muestra la curva de concentraciones probada y una estimación de la sobrevivencia. Por exclusión de tripano se demostró que la disminución en el número de células se debe a muerte y no a inhibición de la proliferación.

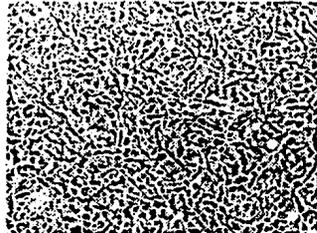
Concentración de RA	Sobrevivencia	Morfología
Control	++++	grumos y tipo fibroblasto
$10^{-9}M$	++++	grumos y tipo fibroblasto
$5 \times 10^{-8}M$	+++	grumos y redondeadas
$10^{-8}M$	++	grumos y redondeadas
$5 \times 10^{-8}M$	+	grumos pequeños y redondeadas
$10^{-7}M$	+	redondeadas
$5 \times 10^{-7}M$	+/-	redondeadas
$10^{-6}M$	-	-
$5 \times 10^{-6}M$	-	-

Tabla 3. Curva de concentraciones de RA y su relación con la muerte y cambio de morfología.

**A.** ES sobre "feeders"



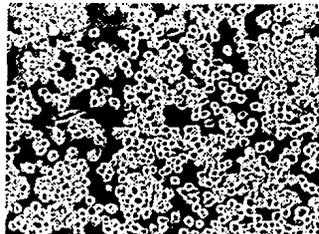
**B.** Control



**C.** Inducción con DMSO



**D.** Inducción con RA



**Figura 8.** Morfología de las células inducidas a diferenciar en presencia de DMSO o RA. **Panel A,** ES teñidas contra ALP sobre monocapa de células "feeder". **Panel B,** células inducidas a formar agregados 7 días y sembradas en caja de cultivo. **Paneles C y D,** células inducidas a formar agregados en presencia de 1% DMSO (panel C) o  $10^{-7}M$  RA (panel D) y sembradas en caja de cultivo 7 días en ausencia de droga.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se establecieron las condiciones para cultivar y manipular a las células ES tanto a nivel molecular como a nivel celular. Se logró establecer la metodología para transfectar y seleccionar células recombinantes con alta eficiencia, lo cual es una herramienta fundamental para el estudio a nivel molecular de los procesos celulares como proliferación o diferenciación. Uno de los objetivos fue establecer un sistema que permitiera bloquear la expresión génica *in vitro* y durante el desarrollo. Como modelo para probar la funcionalidad de un transcrito antisentido producido por el promotor ribosomal se escogió al gene TN-ALP, por las ventajas descritas en la introducción. Se logró seleccionar colonias recombinantes y demostrar que se puede producir RNA antisentido a partir del promotor ribosomal, capaz de bloquear al menos parcialmente la actividad de ALP, posiblemente inhibiendo la traducción del mensajero endógeno. Es importante resaltar la inhibición de la proliferación observada relacionada a la disminución de actividad de ALP, ya que pudiera ésta participar en el control del ciclo celular, que se sabe depende de cascadas de fosforilación-defosforilación. Por lo tanto, consideramos que el gene TN-ALP no fue el mejor modelo, ya que parece ser una proteína vital con varios niveles de regulación que complican el estudio. Parece que las células necesitan encontrar la manera de superar el efecto del transcrito antisentido y que se seleccionan las que logran hacerlo, ya que es inestable el efecto inhibitorio tanto de la actividad de ALP como de la proliferación. Puesto que existen varios genes para ALP, otra regulación pudiera ser a nivel transcripcional, respondiendo a la disminución de la actividad total de ALP activando otro gene. En conclusión podemos decir que el promotor ribosomal sigue siendo una alternativa para generar un transcrito antisentido capaz de bloquear la expresión génica (al menos parcialmente), lo cual resulta útil en un análisis inicial para entender la función de un gene particular, evitando la necesidad de generar ratones quiméricos por recombinación homóloga que, aunque es una estrategia segura, requiere de mucho más tiempo y esfuerzo que el análisis del antisentido. Aún se podría incluso modificar el fragmento promotor para optimizarlo, ya que tiene secuencias repetidas que funcionan como "enhancer", de manera que se podría controlar la fuerza del promotor poniendo o quitando de estas unidades repetidas.

Respecto a la manipulación a nivel celular, al mismo tiempo que en el laboratorio se logró inducir la diferenciación de las células hacia músculo cardíaco, en la literatura se reportó información abundante sobre el proceso de miogénesis y la relación entre la proliferación y la diferenciación celular, que era nuestro objetivo estudiar a largo plazo. En vista de la cantidad de reportes sobre el tema, decidimos concentrarnos en la inducción a la diferenciación con RA. El hecho de que las células se mueran en presencia de RA cuando son inducidas a diferenciar a través de la formación de cuerpos embrionarios, resulta muy interesante debido a la importancia tanto del RA como del control de la muerte celular fisiológica durante el desarrollo. Durante la morfogénesis, la muerte celular resulta una mecanismo eficiente para eliminar las células no deseadas, ya sea por haber sido producidas en exceso, como sucede durante el desarrollo del sistema nervioso, o bien por ser células que hayan funcionado en algún momento de la evolución o el desarrollo y no se necesiten más, como la cola del renacuajo o las regiones entre los dígitos en amnios; también se

puede eliminar de esta manera a las células que migraron hacia una región equivocada. En todos estos casos, se puede proponer un mecanismo de muerte programada regulada por la interacción con otras células<sup>47</sup>. Respecto al mecanismo de muerte como tal, cada vez hay más datos que indican que se lleva a cabo por medio de inducir un estrés oxidativo<sup>48</sup>.

En vertebrados el sistema más estudiado donde ocurre una muerte masiva es el desarrollo del sistema nervioso, durante el cual muere alrededor del 50% de las neuronas que se producen. Se conocen varios factores producidos por las células blanco que promueven la sobrevivencia de las neuronas que las enervan, de manera que se asegura que sólo sobrevivan las células que establecieron las sinapsis adecuadas, así como una correspondencia entre el número de neuronas y el número de células blanco; además, debido al exceso de neuronas generado, se garantiza que todas las células blanco sean enervadas<sup>49</sup>. A partir de este modelo se postuló la hipótesis de que las células tienen encendido un programa endógeno de muerte celular que es reprimido por la presencia de un factor de sobrevivencia<sup>47</sup>.

En base al antecedente de que las ES pueden diferenciar en respuesta al RA, suponemos que éste pone a las células ante el dilema de diferenciar o morir, mismo que pueden enfrentar las células durante el desarrollo. Por lo tanto, nos parece interesante estudiar como "decide" la célula si prolifera, diferencia o se muere. En estudios posteriores variando el protocolo de inducción se logró obtener neuronas detectadas por inmunocitoquímica contra neurofilamentos, lo cual sugiere que el RA induce la diferenciación neuronal y que las células que diferencian se mueren porque no reciben los factores de sobrevivencia que su nuevo fenotipo requiere. Además se estableció que las ES se mueren por estrés oxidativo, ya que requieren de la presencia de  $\beta$ mercaptoetanol ( $\beta$ ME) en el medio para sobrevivir, lo que nos permite inducir la muerte al retirar el  $\beta$ ME.

En conclusión, gracias al trabajo realizado durante la maestría, ahora contamos con un modelo que podemos manipular tanto a nivel molecular introduciendo transgenes, como a nivel celular ya sea induciendo a las células a proliferar, a diferencia o a morir, en cual podemos abordar las preguntas planteadas.

## REFERENCIAS

- 1 Watt, F.M. FASEB, J. 5:287-294. 1991.
- 2 Gilbert, S.F. Developmental Biology. Fourth Edition. 1994.
- 3 Driever, W., Stemple, D., Schier, A. and Solnica-Kresel, L. Trends in Genetics 10(5):152-158. 1994.
- 4 Raff, M.C. Science 243:1450-1455. 1989.
- 5 Spiegelman, B.M. Trends in Genetics 4:203-207. 1988.
- 6 Sul, H.S. Curr. Opin. Cell Biol. 1:1116-1121. 1989.
- 7 Taylor, S.M. and Jones, P.A. Cell 17:771-779. 1979.
- 8 Pine D.F. and Emerson, C.P. Jr. Environ. Health Perspec. 80:221-227. 1989.
- 9 Davis, R.L. Weintraub, H. and Lassar, A.B. Cell 51:987-1000. 1987.
- 10 Mohum, T. . Current Opinion in Cell Biology 4(6):923-928. 1992
- 11 Pera, M.F., Cooper, S., Mills, J. and Parrington, J.M. Differentiation 42:10-23. 1989.
- 12 Robertson, E.J. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. Pub. IRL Press, Oxford, England. 1987.
- 13 Ramirez-Solis, R. Methos in Enzimology...
- 14 Whyatt, L.M., Düwel, A., Smith, A.G. and Rathjen, P. Mol. Cell Biol. 13(12):7971-7976. 1993.
- 15 Schmitt, R.M., Bruyns, E. and Snodgrass, H.R. Genes and Develop. 5:728-740. 1991.
- 16 Gutierrez-Ramos, J.C. and Palacios, R. P.N.A.S. 89:9171-9175. 1992.
- 17 Forrester, L., Bernstein, A. Rossant, J. and Nagy, A. P.N.A.S. 88:7514-7517. 1991.
- 18 Wulf, G.M., Andra, C.N. and Lim, B. EMBO, J. 12(13):5065-5074. 1993.
- 19 Miller-Hance, W.C., LaCorbiere, M., Fuller, S.J., Evans, S.M., Lyons, G., Schmidt, C., Robbins, J. and Chien, K.R. J. Biol. Chem. 268(33):25244-25252. 1993.
- 20 Boer, P. Biochem. Biophys. Res. Comm. 199(2):954-961. 1994
- 21 Weintraub, H.M. Antisense RNA and DNA. Sci. Am. pp. 34-40.1990.
- 22 O'Keefe, S.J., Wolfes, H., Kiessling, A.A. and Cooper, G.M. Microinjection of antisense *c-mos* oligonucleotides prevents meiosis II in the maturing mouse egg. P.N.A.S. 86:7038-7042.1989
- 23 Paria, B.C., Dey, S.K. and Andrews, G.K. Antisense *c-myc* effects on preimplantation mouse embryo development. P.N.A.S. 89:10051-10055.1992.
- 24 Melton, D.A. Injected antisense RNA's specifically block messenger RNA translation *in vivo*. P.N.A.S. 82:144-148.1985.
- 25 Kim, S.T. and Wold, B.J. Stable reduction of thimidine kinase activity in cells expressing high levels of antisense RNA. Cell 42:129-138. 1985.
- 26 McGarry, T.J. and Lindquist, S. Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible antisense RNA. P.N.A.S. 83:399-403. 1986.
- 27 Qian, S., Hongo, S. and Jacobs-Lorena.M. Antisense ribosomal protein gene espression specifically disrupts oogenesis in *Drosophila melanogaster*. P.N.A.S. 85:9601-9605. 1988.
- 28 Patel, B. and Jacobs-Lorena. M. Generation of *minute* phenotypes transformed antisense ribosomal protein gene. Developmental Genetics 13:256-263. 1992.

- 29 Katsuki, M., Sato, M., Kimura, M., Yokoyama, M., Kobayashi, K. and Nomura, T. Conversion of normal behavior to *shiever* by myelin basic protein antisense cDNA in transgenic mice. *Science* 241:593-595. 1988.
- 30 Pepin, M.C., Pothier, F. and Barden, N. Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene. *Nature* 355:725-728. 1992.
- 31 Jones-Villeneuve, E.M.V., McBurney, M.W., Rogers, K.A. and Kalnins, V.I.J. *J. Cell Biol.* 94:253-262. 1982.
- 32 McBurney, M.W., Jones-Villeneuve, E.M.W., Edwards, M. and Anderson, P. *Nature* 299:165-167. 1982.
- 33 McBurney, M. W. *Int. J. Dev. Biol.* 37:135-140. 1993.
- 34 Linney, E. (1992). *Current Topics in Developmental Biology* 27:309-349.
- 35 Morris-Kay, G. (1993). *BioEssays* 15(1):9-15.
- 36 Maden, M. and Holder, N. (1991). *Development supplement* 2:87-94.
- 37 Linney, E. *Current Top. in Dev. Biol.* 27:309-349. 1992.
- 38 Moroni, M.C., Viganó, M.A. and Mavilio, F. *Mechanisms of Dev.* 44:139-154. 1993.
- 39 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Cold Spring Harbor lab. Press. Second edition. 1989.
- 40 NAR. eliminar DNA
- 41 Kuhn, A., Deppert, U. and Grummt, I. *P.N.A.S.* 87:7527-7531. 1990.
- 42 Merchant-Larios, H., Mendelovic, F. and Alvarez-Buylla, A. *Differentiation* 29:145-151. 1985.
- 43 Hahnel, A.C., Rappole, D.A., Millan, J.L., Manes, T., Ziomeck, C.A., Theodosiou, N.G., Werb, Z., Pedersen, R.A. and Schultz, G.A. *Development* 110:555-564. 1990.
- 44 Merino, E., Osuna, J., Bolivar, F. and Soberón, X. *BioTechnics* 12(4):8-9. 1992.
- 45 Giguère, V. *Endocrine Reviews* 15(1):61-79. 1994.
- 46 Yang, Y., Vacchio, M.S. and Ashwell, J.D. *P.N.A.S.* 90:6170-6174. 1993.
- 47 Raff, M.C. *Nature* 356:397-400. 1992.
- 48 Smeynes, R.J. *et. al.* *Nature* 363:166-169. 1993.
- 49 Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishisaki, Y. and Jacobson, M.D. *Science* 242:695-700. 1993.